Aus dem „Hygienischen Institut" der Universität Berlin.
Stellv. Direktor: Prof. Dr. Zeiss.

Über die reduzierenden Fermentwirkungen der Streptokokken gegenüber verschiedenen Substraten.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Zahnärztlichen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Aleksander Herbert Rejch

aus Wloclawek (Polen).

Tag der Promotion: 3. 9. 35.

Druck von P. Detlev
Berlin-Wilmersdorf, Uhlandstr. 130
1935

288

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Magnus

Referent: Priv.-Doz. Dr. Ehrismann

Korreferent: Prof. Dr. Zeiss.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber die reduzierenden Fermentwirkungen der Streptokokken gegenüber verschiedenen Substraten.

Die Untersuchung der reduzierenden fermentativen Fähigkeiten der Bakterien mit Hilfe von Farbstoffen, z. B. des Methylenblau, hat sehr große Bedeutung sowohl für die bakteriologische Diagnostik als auch für die Stoffwechselphysiologie der Bakterien. Auch für die Zusammensetzung der synthetischen Nährböden kann sie Bedeutung haben, da man die organischen Verbindungen, also Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, bestimmen kann, die die betreffende Bakterienart fermentativ anzugreifen imstande ist; denn nur die Stoffe, die abgebaut werden können, sind zum Aufbau der Zelle des Mikroorganismus verwertbar.

Bis jetzt wurden mit der Methylenblaumethodik vor allem die Paratyphus-, Ruhr-, Diphtherie- und Proteusbazillen untersucht. Fermentative Untersuchungen an der Reihe der Streptokokken, die gleichfalls stark reduzierende Wirkungen ausüben, wurden bis jetzt überhaupt nicht ausgeführt.

Ich habe mir auf Anregung des Herrn Privatdozenten Dr. Ehrismann die Aufgabe gestellt, die reduzierende Wirkung der Streptokokken unter den verschiedensten Bedingungen systematisch zu untersuchen.

Die Technik, mit welcher die Versuche ausgeführt worden sind, ist die von Thunberg angegebene. Sie dient zur Prüfung der Fähigkeit von Mikroorganismen, geeignete Stoffe, wie das Methylenblau, als Wasserstoffakzeptoren zu aktivieren und dadurch zu reduzieren. Die Reaktion besteht darin, daß der durch Bakterien aktivierte Wasserstoff des Donators in das Molekül des Methylenblau (Akzeptor) eintritt und es in Leukomethylenblau umwandelt.

Die Methylenblaureduktion dient also zur Feststellung derjenigen organischen Verbindungen, die von der untersuchten Zellart dehydriert werden. Sie kann quantitativ nur unter anaeroben Bedingungen verfolgt werden. Andernfalls würde nämlich das durch die Aufnahme des Wasserstoffes aus dem Akzeptor, in diesem Falle Methylenblau, entstehende Leukomethylenblau durch den Luftsauerstoff wieder oxydiert. Um hohe Sauerstoff-Freiheit und dadurch Exaktheit der Versuchsbedingungen zu erreichen, wurden die dafür sehr geeigneten Thunberg-Röhrchen angewandt. Das Prinzip der Versuche besteht darin, daß man eine geeignete Methylenblaulösung als Wasserstoffakzeptor und das zu untersuchende Substrat als Wasserstoffdonator mit der Bakterienaufschwemmung in einem Thunberg-Röhrchen zusammenbringt. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wird die über der Flüssigkeit befindliche Luft evakuiert. Danach werden die Röhrchen in ein, in Glas befindliches, elektrisch geheiztes Wasserbad, das stets auf 37° C. gehalten wird, hineingebracht und die Reaktion wird verfolgt.

Was die verwendeten Substanzen: Methylenblau, den zu untersuchenden Wasserstoffdonator und die Bakterien betrifft, so wurden immer sämtliche in steriler, gepufferter physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst bezw. suspendiert. Als Puffer dienten: 1 Gramm Kaliumphosphat (zweibasisch) und 1 Gramm Natriumphosphat (einbasisch) auf 1 Liter physiologischer Kochsalzlösung. Die Wasserstoffionen-Konzentration wurde auf 7,5 pH gebracht. Die geeignete molekulare Konzentration des Methylenblaus und der Substrate wurde weiter in folgenden Versuchsprotokollen bestimmt:

Bakterienaufschwemmungen. Es wurden zwei Streptokokkenstämme untersucht: Der Stamm Aronson vom Hygienischen Institut, Berlin, und ein hämolytischer Stamm, von einer Leiche (Sepsis von der Tonsille) rein gezüchtet. Es wurden mehrere Reagenzröhrchen mit ca. 8 ccm Nährmedium (40 Gramm Pepton Witte, 5 Gramm Kochsalz, 2 Gramm Traubenzucker 7,4 pH) beimpft und 24 Stunden bei 37° C. bebrütet. Mit dem Inhalt dieser Röhrchen wurden dann mehrere Pasteur-Kolben, welche Nährmedium enthielten, beimpft und ebenso bebrütet. So wurde die für die Versuche notwendige Menge Bakterien gewonnen. Nach dem Abzentrifugieren des Nährbodens wurde das Bakteriensediment dreimal mit der gepufferten physiologischen Kochsalzlösung gewaschen und danach in einer gleichen Lösung suspendiert. Die Waschungen waren nötig, da sonst die Kontrollen, in die anstatt des Wasserstoffdonators physiologische Kochsalzlösung gegeben war, sich durch die Reste des Nährbodens oder der in den Bakterienleibern befindlichen Eigendonatoren gleichfalls entfärbten (sog. Spontanreduktion). Nach den Waschungen dagegen entfärbten sich die Kontrollen erst nach 8 bis

24 Stunden, einer Zeit, die für uns als praktisch unendlich gelten kann. Vor jeder Versuchsreihe wurde ein Grampräparat zur Prüfung auf Reinheit der Kultur angefertigt. War ein Versuchsröhrchen undicht, so bildete sich oft durch den Zutritt des Luftsauerstoffes in der oberen Flüssigkeitsschicht ein blauer Ring. Leukomethylenblau wurde wieder zu Methylenblau oxydiert. Solche Versuche waren ungenau und mußten ausscheiden. Ueberhaupt mußte jeder Versuch mindestens gleichzeitig zwei- bis dreimal wiederholt werden, um eine möglichst große Genauigkeit zu erreichen.

Einmal wurden die Bakterien nicht 24 Stunden, sondern 48 Stunden bebrütet, um mehr Material zu erhalten. Das Wachstum war danach zwar dichter geworden, aber man mußte viel dichtere Bakterienaufschwemmungen verwenden, um gute, kurze Reaktionszeiten zu erzielen. Die Versuche haben gezeigt, daß junge Kulturen aktiver als ältere sind. Hierzu verweise ich auf anliegende Tabelle 1. Deshalb wurde weiterhin immer nur 24 Stunden bebrütet. Auch wenn die Aufschwemmung in Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt wurde, büßte sie von Tag zu Tag mehr an Aktivität ein. Nach drei bis vier Tagen war sie nicht mehr gebrauchsfähig, deshalb war es vorteilhaft, um gute Vergleichsresultate zu erzielen, an einem Tage mit frischer Aufschwemmung viele Versuche durchzuführen.

Um Anhaltspunkte über die Menge der Bakterien in den Aufschwemmungen zu haben, wurden die Bakterien mit Hilfe des Mollschen Trübungsmessers gezählt. Die drei Substanzen: Donator, Akzeptor und Bakterienaufschwemmung wurden zu gleichen Teilen in Versuchsröhrchen gebracht (je 2 ccm, zusammen 6 ccm). Nur bei der Prüfung der Beeinflussung der Reaktionen durch Zusatz von Zyankali, Natriumfluorid und Bromessigsäure wurde die Gesamtmenge auf 8 ccm erhöht.

Ich gehe nun dazu über, die Beobachtungen zu beschreiben:

Als erstes mußte die für die betreffenden Streptokokken geeignete Konzentration der Methylenblaulösung bestimmt werden. Das Methylenblau ist ein Antiseptikum, das manchen pathogenen Bakterienarten gegenüber sogar in verhältnismäßig starken Verdünnungen wirksam ist. Da viele, wenn auch nicht alle, Fermentfunktionen mit dem Leben und der intakten Struktur der Bakterien innig verknüpft sind, so wird durch zu starke Methylenblaukonzentration die dehydrierende Wirkung aufgehoben. Es wurden folgende Verdünnungen des Methylenblaus geprüft: m/1000, m/10 000, m/20 000, m/40 000.

Als Wasserstoffdonatoren wurden: Glukose, Maltose, Saccharose von 0,02 mol. verwendet.

Ergebnisse:

Bakterien	H-Donator	H-Akzeptor	Dehydrierungszeit
Bakterien-Aufschwemmung	Glukose	Methylenblau	m/1000 —
„	Maltose	„	m/1000 —
„	Saccharose	„	m/1000 —
„	Glukose	„	m/10 000 6 Minuten
„	Maltose	„	m/10 000 6 „
„	Saccharose	„	m/10 000 9 „
„	Glukose	„	m/20 000 6 „
„	Maltose	„	m/20 000 7 „
„	Saccharose	„	m/20 000 9 „
„	Glukose	„	m/40 000 6 „
„	Maltose	„	m/40 000 5 „
„	Saccharose	„	m/40 000 8 „

Mit Ausnahme der m/1000-Konzentration, die die Funktion vollkommen aufhebt, zeigen die anderen Verdünnungen keinen Unterschied im zeitlichen Verlauf der Dehydrierung. Da die m/10 000-Konzentration eine sehr deutliche Färbung bewirkt und dadurch größere Genauigkeit der Versuche zuläßt, wurde diese ausschließlich weiter benutzt.

Als nächstes soll die Abhängigkeit der Dehydrierungszeit erstens (I) von der Konzentration des Substrates, zweitens (II) von der Zahl der Bakterien in der Aufschwemmung untersucht werden.

I. Versuche mit Substraten von verschiedener molekularer Konzentration.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson, in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad 37 % (5808 mill/ccm).

Methylenblaulösung: m/10 000. Substrat: Maltose: 0.02 m.

Protokoll der Versuche.

Dehydrierungszeit:

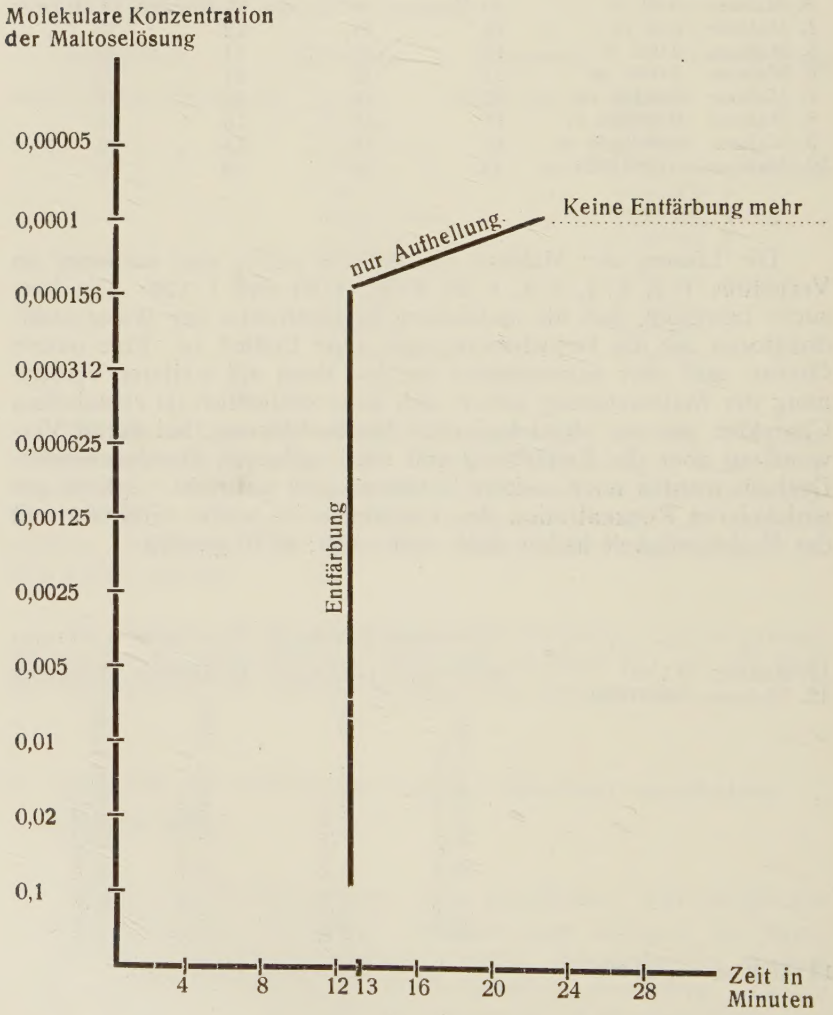
1. Donatorfreie Kontrolle nach 24 Stunden heller, aber nicht entfärbt
2. Donatorfreie Kontrolle nach 8 Stunden entfärbt.

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
3. Maltose 0.02 m	14 Minuten	13 Minuten	13 Minuten	14 Minuten
4. Maltose 0.01 m	13 „	13 „	12 „	13 „
5. Maltose 0.005 m	14 „	13 „	11 „	12 „
6. Maltose 0.0025 m	17 „	12 „	11 „	13 „
7. Maltose 0.00125 m	12 „	12 „	14 „	13 „
8. Maltose 0.000625 m	11 „	11 „	13 „	13 „
9. Maltose 0.0003125 m	13 „	12 „	13 „	14 „
10. Maltose 0.00015625 m	14 „	13 „	15 „	13 „

Die Lösung der Maltose von 0.02 m wurde also verdünnt im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128. Die Versuche beweisen, daß die molekulare Konzentration der Wasserstoffdonatoren auf die Dehydrierungszeit ohne Einfluß ist. Eine untere Grenze muß aber angenommen werden, denn mit weiterer Verdünnung der Maltoselösung nähert sich diese schließlich im chemischen Charakter unserer physiologischen Kochsalzlösung, bei deren Verwendung aber die Entfärbung erst nach mehreren Stunden eintritt. Deshalb wurden noch weitere Verdünnungen m/10 000 — gleich der molekularen Konzentration des Farbstoffes — weiter m/20 000 und der Vollständigkeit halber auch nach oben: m/10 geprüft.

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
11. Maltose 0.1 m	13 Minuten	14 Minuten	12 Minuten	13 Minuten
12. Maltose m/10 000	nach 22 Minuten heller, aber nicht entfärbt	nach 25 Minuten heller, nicht entfärbt	nach 23 Minuten heller, nicht entfärbt	nach 26 Minuten heller, nicht entfärbt
13. Maltose m/20 000	keine Entfärbung eingetreten.			

Graphische Darstellung.



Erklärung zur graphischen Darstellung. Für die Konzentrationen des Substrates von 0.1 m bis 0,000156 ergeben sich die gleichen Dehydrierungszeiten, durchschnittlich 13 Minuten. In diesem Bereich ergibt sich also eine gerade Linie. Erst bei noch niedrigerer Konzentration (0.0001 m), wobei Substrat- und Methylenblaukonzentration von der gleichen Größenordnung sind, tritt nach 24 Minuten nur Aufhellung, aber keine Entfärbung mehr ein. Es reicht scheinbar der vorhandene Wasserstoff nicht mehr aus, um die Entfärbung herbeizuführen. Geht man zu einer noch größeren Verdünnung (0.00005) über, so bleibt die Entfärbung völlig aus. Die Höhe dieser Konzentration wird von der Kurve nicht mehr geschnitten.

II. Versuche mit Bakterien-Aufschwemmungen von verschiedener Dichte.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson, in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad 24 % (3432 mill/ccm).

Methylenblaulösung: m/10 000. Substrat: Maltose: 0.02 m.

Die Bakterien-Aufschwemmung wurde in der Weise verdünnt, daß zu je 10 ccm der Aufschwemmung jeweils 5 ccm (2. Verdünnung), 10 ccm (3. Verdünnung), 15 ccm (4. Verdünnung), 20 ccm (5. Verdünnung) und 25 ccm (6. Verdünnung) gepufferter physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt wurden.

Protokoll der Versuche.

	Dehydrierungszeiten in Minuten:			
	1. Versuch	1. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Donatorfreie Kontrolle:	4 Röhrchen nach 8 Stunden unverändert.			
1. Verdünnung:	9 Minuten	10 Minuten	10 Minuten	9 Minuten
2. „	14 „	14 „	13 „	13 „
3. „	21 „	21 „	23 „	21 „
4. „	25 „	24 „	26 „	25 „
5. „	32 „	34 „	33 „	32 „
6. „	40 „	35 „	35 „	40 „

Die vorbereitete Bakterien-Aufschwemmung reduzierte also mit Maltose das Methylenblau innerhalb von 9 bis 10 Minuten. Weiterhin erhellt, daß die Differenzen in den Dehydrierungszeiten bei den Versuchen mit der gleichen Bakterien-Konzentration wachsen, je länger die Versuchszeiten dauern, stets aber etwa 10 % betragen.

Die Versuche beweisen, daß bei dem gleichen Wasserstoffdonator — Maltose — die Reduktionsgeschwindigkeit des Methylenblau von der Anzahl der Bakterien in der Aufschwemmung abhängig ist. Die Deutlichkeit des Ergebnisses dürfte die Veranschaulichung durch graphische Darstellung überflüssig machen.

Bemerkt sei noch, daß die molekulare Konzentration des Substrates mit 0.02 m beibehalten wurde, trotzdem durch die früheren Versuche die Unabhängigkeit des Verlaufs der Reaktion von der molaren Konzentration bewiesen wurde.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Messung der Ausgangs-Aufschwemmung mit dem Moll'schen Trübungsmesser eine Dichte von 3432 mill/ccm für die Bakterien zeigt, ergeben sich für die vorstehend angeführten Verdünnungen folgende Werte für die Anzahl der Bakterien je Kubikzentimeter:

1.	Verdünnung	3432	Millionen
2.	„	2288	„
3.	„	1716	„
4.	„	1373	„
5.	„	1144	„
6.	„	981	„

Nachdem nun die Abhängigkeit der Dehydrierungszeiten von der Konzentration des betreffenden Substrates, des Farbstoffes und der Bakterien-Aufschwemmung geprüft worden ist, kann jetzt zur Prüfung der Eignung der Substrate als Wasserstoffspender übergegangen werden. Es wurde nicht nur Wert darauf gelegt, die Eignung oder Nichteignung der Substrate als Wasserstoffspender zu untersuchen, sondern auch den Unterschied im zeitlichen Ablauf der Dehydrierung bei den verschiedenen Substraten festzustellen.

Zu den Zeitangaben ist zu bemerken, daß diese immer nur relative Werte darstellen können, da die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes bei dem gleichen Wasserstoffdonator von der Aktivität der benutzten Bakterien-Aufschwemmung abhängig ist. Diese wiederum hängt von vielen Faktoren wie: Zeit der Bebrütung, Anzahl der Bakterien, Art des Nährbodens, Alter der Aufschwemmung und vielen anderen ab.

Die nun folgenden einzelnen Protokolle beziehen sich jeweils auf Versuche, die mit der gleichen Bakterien-Aufschwemmung an einem Tage durchgeführt worden sind.

Es wurden absichtlich an einem Tage z. B. nicht alle Kohlenhydrate oder alle organischen Säuren durchgeprüft, sondern Vertreter der verschiedenen Substratgruppen in zwangloser Folge. Dadurch sollte nicht nur erreicht werden, die Zeitunterschiede im Ablauf der Dehydrierung innerhalb einer Substratgruppe überblicken zu können, z. B. diejenigen bei Maltose, Saccharose, Arabinose und Galaktose, sondern auch die bei den verschiedenen Gruppen unter-

einander, also z. B. diejenigen bei Maltose, Alanin, den Alkoholen und anderen. Das Ideal wäre gewesen, am gleichen Tage mit der gleichen Bakterien-Aufschwemmung sämtliche Substrate durchzuprüfen. Dies war aber technisch kaum durchführbar, besonders, da jeder Versuch zweimal, in Zweifelsfällen noch häufiger wiederholt werden mußte.

Tabelle 1.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson, in Nährmedium gezüchtet, 48 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad 31 % (4664 mill/ccm).

Methylenblaulösung: m/10 000.

Wasserstoffdonatoren in 0.02 m Konzentration.	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	Ergebnis:
Donatorfreie Kontrolle	270	340		
Maltose	17	19	20	+ + + +
Glukose	18	23	19	+ + + +
Lävulose	33	27		+ + +
Saccharose	27	28		+ + +
Stärke gesätt. Lsg.	22	20	21	+ + + +
Arabinose	120	111	117	+
Glycerin	20	22	23	+ + + +
Glycerinaldehyd	29	30	27	+ + +
Weinsaures Natrium	-	—		—
Essigsaures Natrium				
Acetamid	158	162	—	+
Alanin	82	82	85	+ +
Asparagin	90	97	90	+ +
Leucin	95	97	100	+ +
Cystin	178	190	—	+
Glykokoll	128	132	—	+
Tryptophan gesätt. Lsg.	84	74	77	+ +
Tyrosin gesätt. Lsg.	Nach 220 Min. heller, nicht entfärbt	Nach 230 Min. heller, nicht entfärbt		

Bei dieser Tabelle ist bemerkenswert: Die Bakterien wurden 48 Stunden bebrütet — die Dehydrierungszeiten waren trotz der hohen Zahl der Bakterien in der Aufschwemmung verhältnismäßig lang. Die Fermentaktivität der Bakterien wurde offenbar durch die lange Bebrütungszeit herabgesetzt.

Tabelle 2.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson, in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen. Trübungsgrad: 22 % (3124 mill/ccm).

Methylenblaulösung: m/10 000.

Wasserstoffdonatoren in 0.02 m Konzentration	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Donatorfreie Kontrolle	270	270	heller aber nicht entfärbt.
Lävulose	8	8	++++
Glukose	7	8	++++
Stärke gesätt. Lsg.	35	47	+++
Galaktose	52	56	+++
Rhamnose	171	heller	+
Xylose	7	9	++++
Arabinose	62	73	++
Inulin	—	—	—
Methylalkohol 0.1 m	—	—	?
Aethylalkohol 0.1 m	12	13	++++
Propylalkohol 0.1 m	15	16	++++
Buthylalkohol 0.1 m	17	22	++++
Amylalkohol 0.1 m	—	—	—
Erytrit	58	52	++
Dulzit	189	180	+
Mannit	88	92	++
Glykokoll	25	29	++++
Asparagin	78	82	++
Leucin	118	108	+
Alanin	36	43	+++
Sarkosin	111	100	+
Apfels. Ammonium	56	58	++
Natriumcitrat	—	—	—
Bernsteins. Ammonium	—	—	—
Natrium Formicum	20	24	+++
Natrium Laktat	7	7	++++
Fumarsäure	—	—	—
Glutamins. hydrochlorid	16	19	++++
Brenztraubensäure	20	18	++++
Succinamid	159	171	+
Propionamid	166	180	+

Tabelle 3.

Die gleiche Aufschwemmung wie in Tabelle 2, nur: Versuche 24 Stunden später durchgeführt.

Wasserstoffdonatoren in 0.02 m Konzentration	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Donatorfreie Kontrolle	—	—	—
Galaktose	62	65	++
Stärke gesätt. Lsg.	35	47	+++
Inulin gesätt. Lsg.	434	427	?
Alanin	74	60	++
Asparagin	100	109	+
Glykokoll	84	76	+
Leucin	150	162	+
Methyl-Alkohol 0.1 m	280	281	heller
Aethyl-Alkohol 0.1 m	20	18	++++
Propyl-Alkohol 0.1 m	17	22	++++
Butyl-Alkohol 0.1 m	15	16	++++
Amyl-Alkohol 0.1 m	—	—	—
Dulcit 0.1 m	189	180	+
Mannit 0.1 m	111	120	+
Rhamnose 0.1 m	175	—	?
Natrium Laktat	8	9	++++
Brenztraubensäure	27	27	++++
Glutamins. Hydrochlorid	31	29	++++
Propyons. Natrium	—	—	—
Natriumoxalat	95	100	+
Natriumcitrat	—	—	—
Natriumformicum	40	38	+++
Fumarsäure	—	—	—
Weins. Natrium	131	168	+
Butters. Ammonium	—	—	—
Apfels. Ammonium	137	118	+

Tabelle 4.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson, in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad: 33 % (5016 mill/ccm).

Methylenblaulösung: m/10 000.

Wasserstoffdonatoren in 0.1 m Konzentration.	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Donatorfreie Kontrolle	—	—	—
Lävulose	12	16	++++
Raffinose	18	22	++++

Wasserstoffdonatoren in 0.1 m Konzentration.	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Rhamnose	—	—	—
Sorbit	56	74	+ +
Guanidincarbonat	—	—	—
Formamid	—	—	—
Harnstoff	—	—	—
Formaldehyd	—	—	—
Acetaldehyd	—	—	—
Propylaldehyd	80	126	+
Glycerinaldehyd	34	32	+ + + +
Glycerin	19	22	+ + + +

Tabelle 5.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus haemolyticus, in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad: 42 % (6864 mill/ccm).

Methylenblaulösung m/10 000.

Wasserstoffdonatoren in 0.1 m Konzentration.	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Donatorfreie Kontrolle	360	290	—
Lävulose	20	20	+ + +
Glukose	13	14	+ + + +
Maltose	14	14	+ + + +
Saccharose	23	21	+ + + +
Arabinose	90	76	+ +
Stärke	15	13	+ + + +
Galaktose	65	70	+ +
Xylose	14	12	+ + + +
Mannit	100	90	+
Inulin	—	—	—
Methylalkohol	—	—	—
Aethylalkohol	16	18	+ + + +
Propylalkohol	18	22	+ + + +
Butylalkohol	18	18	+ + + +
Amylalkohol	—	—	—
Alanin	58	56	+ +
Asparagin	55	57	+ +
Glykokoll	45	49	+ +
Cystin	147	—	?
Guanidinkarbonat	—	—	—
Harnstoff	—	—	—
Formaldehyd	—	—	—
Propylaldehyd	95	125	+
Glyzerinaldehyd	22	24	+ + +
Glyzerin	16	17	+ + + +
Acetaldehyd	—	—	—

Wasserstoffdonatoren in	Zeit der Dehydrierung in Minuten.		
0.1 m Konzentration.	1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis:
Natriumlaktat	37	39	+ + +
Natriumcitrat	—	—	—
Fumarsäure	—	—	—
Buttersaures Ammonium	—	—	—
Weinsaures Natrium	—	—	—
Oxalsaures Natrium	147	160	+

In allen Tabellen bedeutet: — (minus) negativen Ausfall, also keine Entfärbung.

Besprechung der Tabellen.

Uebersieht man die in den Tabellen angeführten Ergebnisse, die sich auf mehrere Versuche mit der gleichen Substanz stützen, so bemerkt man vor allem die starke dehydrierende Wirkung der **Kohlenhydrate,** die als wichtige Energiequelle von Bedeutung sind.

Die meisten Zucker haben sich als die schnellst dehydrierenden Substrate erwiesen.

1. **Monosaccharide:** Von den Pentosen wurden die Xylose und Arabinose untersucht. Sehr stark wirksam erwies sich die Xylose, welche der Glukose und Maltose z. B. in ihrer Wirkung gleichstand. Weniger wirksam war die Arabinose und zwar reduzierte die Xylose in 9 Minuten, während die Arabinose zur gleichen Reduktion ungefähr 62 Minuten benötigte. Von den Hexosen wurden die wichtigen Zucker wie Glukose, Lävulose und Galaktose untersucht. Bei diesen war stets die Aldohexose Glukose stärker wirksam als der Ketozucker Lävulose. Galaktose war in ihrer Wirkung schwächer, jedoch etwas schneller als Arabinose.

2. **Disaccharide:** Rohrzucker (Saccharose), Maltose. Maltose starke Wirkung gleich der Glukose. Saccharose zeigte auch starke Wirkung, aber konstant schwächer als Maltose oder Glukose.

3. **Das Trisaccharid** Raffinose, Tabelle 4 (wird gespalten in Glukose, Fruktose und Galaktose) wurde schnell dehydriert, etwas langsamer als Lävulose (Lävulose 12 Minuten, Raffinose 20 Minuten).

4. Von den **höheren Kohlenhydraten** wurde Stärke und Inulin untersucht. Da deren molekulare Gewichte unbekannt

und die Substrate schwer löslich waren, wurde eine gesättigte Lösung angewandt. Stärke wurde langsamer als die Zucker (Maltose, Glukose etc.) dehydriert – in etwa 35 Minuten – während Lävulose im gleichen Fall bereits nach 8 Minuten dehydriert wurde. Inulin dagegen kann als unwirksam bezeichnet werden. Vielleicht liegt dies an der geringen Wasserlöslichkeit des Inulins.

Das Laktat gehörte zu den am schnellsten wirkenden Substraten. Die Dehydrierungszeit war gleich der der Maltose und Glukose.

Alkohole. Von den einwertigen Alkoholen war Aethylalkohol konstant am wirksamsten. Seine Wirksamkeit war ungefähr ebenso groß, wie im gleichen Fall die der Saccharose. Etwas länger war die Dehydrierungszeit bei Propylalkohol und Butylalkohol, jedoch ergaben auch sie noch eine rasche Dehydrierung. Sehr langsam zwar, aber schließlich doch angegriffen wurde Methylalkohol. Amylalkohol dagegen war als Wasserstoffdonator völlig unwirksam. Der dreiwertige Alkohol Glycerin wurde etwa ebenso rasch wie die wirksamen Zucker dehydriert. Außer diesen wurden die Alkohole: Erythrit, Mannit, Sorbit und Dulzit geprüft. Von diesen wurden am schnellsten Sorbit und Erythrit, langsamer Mannit, sehr langsam Dulzit angegriffen.

Was die **organischen Säuren** anbetrifft, so geht aus den Tabellen hervor, daß die untersuchten Streptokokken ihnen gegenüber verschiedenes Verhalten zeigten. Sie wurden in Lösung in Form von neutralen Natrium-, Ammonium- oder Hydrochlorid-Salzen angewandt. In den Fällen, in denen die Chemikalien nicht in Form neutraler Salze vorhanden waren, mußten die Säurelösungen auf 7,5 pH alkalisiert werden.

Die wirksamsten unter ihnen waren, außer dem schon früher besprochenen Natriumlaktat die Glutaminsäure, Brenztraubensäure und Ameisensäure. Diese Säuren gehören zu den sehr guten Wasserstoffspendern. Weiter folgte in der Zeitreihe die Apfelsäure (50 Minuten, während Ameisensäure und Glutaminsäure im gleichen Fall etwa 20 Minuten gebrauchten). Weinsäure und Oxalsäure wurden unregelmäßig, und zwar in Abhängigkeit von der betreffenden Bakterien-Aufschwemmung manchmal angegriffen; in anderen Fällen blieben sie wirkungslos. Nicht angegriffen wurden: Buttersäure, Propionsäure, Fumarsäure.

Die **Aminosäuren und andere stickstoffhaltige Substrate** wurden zum größten Teil dehydriert, benötigten dazu aber

viel mehr Zeit als z. B. die schnell wirkenden Zucker. Weiterhin die wirksamsten waren: Alanin, Asparagin, Leucin, Glykokoll. Ihnen folgen: Tryptophan (gesättigte Lösung), Cystin und Sarkosin. Nicht dehydriert hingegen wurden Tyrosin, Guanidin, Harnstoff. Da das Tyrosin nur in geringem Maße in Wasser löslich ist, wurde eine gesättigte Lösung angewandt.

Außer diesen Substraten wurden noch Formaldehyd, Acetaldehyd, Propylaldehyd und Glycerinaldehyd untersucht. Stark wirksam war Glycerinaldehyd, nur wenig langsamer als Glycerin, Propylaldehyd wurde nur schwer angegriffen.

Die **Amide:** Propion-, Succin- und Acetamid entfärbten sich schneller als die donatorfreien Kontrollen. Formamid blieb wirkungslos.

Der hämolytische Stamm ergab bei den untersuchten Substraten fast die gleichen Resultate wie der Aronson-Stamm. Die einzige stärkere Abweichung zeigte sich bei Natriumlaktat, welches langsamer angegriffen wurde. Es sei bemerkt, daß die bei dem hämolytischen Stamm angestellten Versuche nicht so gleichmäßige Resultate ergaben, wie bei dem Aronson-Stamm.

Unter zwei besonderen Bedingungen wurde noch weiter der Verlauf der Dehydrierung geprüft. Erstens wurde der Einfluß der Lichteinwirkung und zweitens der Einfluß durch Zusatz von Kaliumzyanid-Lösung m/100 — als sehr starkem Fermentgift —, Natriumfluorid-Lösung m/100 und Bromessigsäure-Lösung m/100 geprüft.

I. Was die Beeinflussung durch Lichteinwirkung betrifft, so konnte ein zeitlicher Unterschied im Ablauf der Dehydrierung einerseits bei Abdeckung des Bades und dadurch erzielter Verdunkelung, andererseits bei Bestrahlung durch Sonnenlicht nicht festgestellt werden. Infolge technischer Schwierigkeiten konnte aber diese Seite der Versuche nicht so eingehend behandelt werden, wie es an sich notwendig erschiene. Da die Untersuchungen hierbei Zeitunterschiede nicht ergaben, wurde auf die Angabe der Dehydrierungszeiten verzichtet.

II. Die Beeinflussung der Dehydrierungszeit durch den Zusatz von Zyankalilösung m/100, Natriumfluoridlösung m/100 und Bromessigsäurelösung m/100.

Protokoll der Versuche.

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus haemolyticus, in Nähr-

medium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: Trübungsgrad: 24 % (3410 mill/ccm). Methylenblaulösung m/10 000.

Wasserstoffdonatoren in 0.1 m Konzentration.	Zeit der Dehydrierung in Minuten. 1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Donatorfreie Kontrolle	210	240		
Glukose	7	11	7	
Glukose + KCN Lsg.	4	4	5	4
Glukose + NaF Lsg.	15	16	15	17
Glukose + CH 2 BrCOOH	78	69	84	
Natriumlaktat	32	33	30	28
Natriumlaktat + KCN Lsg.	--	180	160	
Natriumlaktat + NaF Lsg.	38	42	40	
Natriumlaktat + CH_2 BrCOOH	180	140	150	
Alanin	50	60	58	
Alanin + KCN	44	46	45	
Alanin + CH_2 BrCOOH	nach 140 Minuten unverändert			
Maltose	9	8	9	
Maltose + KCN Lsg.	4	4	5	

Bakterien-Aufschwemmung in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Bakterien: Streptococcus Aronson in Nährmedium gezüchtet, 24 Stunden bebrütet, abzentrifugiert, dreimal in gepufferter physiolog. Kochsalzlösung gewaschen. Dichte der Bakterien in der Aufschwemmung mit Moll'schem Trübungsmesser gemessen: 5016 mill./ccm.

Lävulose	16	17	17	17
Lävulose + KCN Lsg.	8	10	9	
Lävulose + NaF Lsg.	22	24	24	
Lävulose + CH_2 BrCOOH	69	78	79	
Donatorfreie Kontrolle	nach 6 Stunden unverändert.			

Bei diesen Versuchen mußte die Gesamtmenge der Flüssigkeit im Röhrchen durch den Zusatz dieser Chemikalien auf 8 ccm erhöht werden. Um Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten, wurden die Versuche ohne Zusatz auch auf 8 ccm verdünnt. Da die Versuche mit Zyankalilösung ein unerwartetes Resultat, nämlich Beschleunigung der Reaktion brachten, wurden noch zur Klärung des Sachverhaltes

Versuche:

I. sowohl mit Zyankalilösung Bakterien und Methylenblau, als auch

II. mit Zyankalilösung, Methylenblau und Wasserstoffdonator (also ohne Bakterienaufschwemmung) angestellt. Donator: Glukose.

Protokoll der Versuche:	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
I.	—	—	—
II.	45	45	45

Besprechung der Ergebnisse:

I. Natriumfluorid. Der Zusatz von Natriumfluorid bewirkte eine deutliche Hemmung der Reaktion sowohl bei der Glukose, wie auch bei Natrium Laktat. Glukose ohne Zusatz von Natriumfluorid z. B. entfärbte das Methylenblau innerhalb von 7 bis 11 Minuten. Diese hemmende Wirkung des Fluorids ist schon länger bekannt. „Sie wurde sehr eingehend geprüft bei der Gärung der tierischen Gewebe und der Hefe. Fluorid soll nämlich nach Embden, Lohmann und Lippmann die Abspaltung des Phosphates aus dem als Zwischenprodukt bei den Reaktionen entstehenden Hexosephosphat hemmen, außerdem soll Fluorid die Umwandlung von primär gebildeten Hexosephosphorsäureestern in einen schwer hydrolisierbaren, reaktionsunfähigen Ester bewirken.*)"

Eine noch viel größere Hemmung der Reaktion wird durch die Giftwirkung der Bromessigsäure bewirkt. Der Mechanismus der Hemmung durch Bromessigsäure ist ähnlich wie der der Reaktion mit Natriumfluorid.

Die interessantesten Ergebnisse ergaben sich bei Zusatz von m/100 Zyankalilösung. Man müßte annehmen, daß die Blausäure als sehr starkes Fermentgift die fermentative Wirkung der Bakterien hemmen würde. Dies war jedoch nicht der Fall, wie aus der Tabelle ersichtlich ist. Im Gegenteil erfolgte die Reduktion des Methylenblau noch schneller. Es wurde der Einfluß des Zyankalizusatzes bei der Dehydrierung der Zucker Glukose und Maltose, der Aminosäure Alanin und des Natriumlaktat geprüft. Glukose, Maltose und Alanin entfärbten sich schneller als die, mit denselben Wasserstoffdonatoren ohne Zyankalizusatz, zum Vergleich angestellten Versuche. Anders Natriumlaktat. Hier trat eine Hemmung der Dehydrierung durch Zyankalizusatz ein.

Daß die Reduktion bei Zusatz einer verhältnismäßig sehr starken Konzentration erfolgt, ist gut erklärlich. Manche Bakterien zeigen eine sehr große Widerstandsfähigkeit und Unempfindlichkeit der Blausäure gegenüber. Zu diesen gehören anscheinend auch die Streptokokken.

Die kürzere Dehydrierungszeit, die bei allen Versuchen mit Zyankalizusatz, ausgenommen bei denen mit Laktat, eintrat, da es sich hierbei nicht um einen Zufall handeln kann — kann auf folgende Weise erklärt werden: Zyankalilösung mit Wasserstoffdonator (Glukose) entfärbte das Methylenblau auch ohne Bakterien, allerdings langsam (in 45 Minuten). Es tritt also in den Versuchen wahrscheinlich eine summierte Wirkung von Bakterien und Zyankali ein, wodurch die schnelle Entfärbung verursacht wird.

*) Handbuch der Biochemie v. Oppenheimer, Ergänzungswerk, erster Band zweiter Halbband.

Noch eine andere Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen. Oppenheimer*) sagt hierüber: „Die Hemmung der Atmung der Zellen, die durch die Einwirkung der Blausäure zustande kommt, ist bekannt. Es gibt jedoch Zellen, deren Atmung unter vielen Bedingungen durch Blausäure nicht nur nicht gehemmt, sondern gesteigert wird. Das erste Objekt dieser Art, die Grünalge Chlorella, hat Warburg gefunden." Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch bei den untersuchten Streptokokken die fermentative Wirkung durch Zyankali gesteigert wird. — Jedenfalls würde es sich lohnen, ausgedehntere Versuche über diesen Punkt, auch an anderen Bakterienarten, durchzuführen, als dies in der vorliegenden Arbeit möglich war.

*) Handbuch der Biochemie v. Oppenheimer, Ergänzungswerk, erster Band zweiter Halbband.

Schlußfolgerungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden:

I. die für die gesamten Versuche geeignete Methylenblaulösungs-Konzentration bestimmt,

II. wurde die Abhängigkeit des Ablaufes der Dehydrierung von der molekularen Konzentration des Wasserstoffdonators einerseits und

III. von der Anzahl der Bakterien in der benutzten Aufschwemmung andererseits untersucht,

IV. wurde eine größere Anzahl von Substraten auf ihre Eignung als Wasserstoffdonatoren bei zwei verschiedenen Streptokokken-Stämmen geprüft. (Ergebnisse in Tabellen angegeben).

V. wurde Veränderung des Ablaufes der Reaktion durch den Zusatz von Zyankali, Natriumfluorid und Bromessigsäure nachgewiesen.

Es ist mir ein Bedürfnis, am Schluß der Arbeit Herrn Professor Dr. Zeiß und Herrn Privatdozent Dr. Ehrismann für die Ueberlassung des Themas sowie für die fördernden Anregungen verbindlichst zu danken.

Lebenslauf.

Ich Aleksander Herbert Rejch bin als Sohn des Fabrikanten David und seiner Ehefrau Helene Rejch in Wloclawek (Polen) im Jahre 1911 geboren. Von 1921 bis 1930 besuchte ich das staatliche Oberrealgymnasium in Wloclawek, welches ich im Mai 1930 mit dem Maturitätszeugnis verließ. Im Jahre 1930 kam ich nach Berlin und legte im April 1931 eine Ergänzungsprüfung gemäß den Anforderungen der Reifeprüfung eines preußischen Realgymnasiums ab. Danach wurde ich in die medizinische Fakultät der „Friedrich-Wilhelm-Universität“ zu Berlin aufgenommen und begann Zahnheilkunde zu studieren. Im November 1932 bestand ich das Physikum und im Juni 1935 das Staatsexamen.